

ЯКУШЕВА АЛЕКСАНДРА ВИКТОРОВНА

**ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ В РЕАКЦИЯХ
АМИНОКИСЛОТ С ИЗОТИОЦИАНАТАМИ**

02.00.06 – Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВПО «КНИТУ»)

Научный руководитель: кандидат химических наук
Спиридонова Регина Романовна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Кутырев Геннадий Андреевич

доктор химических наук, профессор
Несын Георгий Викторович

Ведущая организация: ГОУ ВПО Санкт-Петербургский
государственный технологический
институт (Технический университет).

Защита состоится «2» ноября 2011 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.080.01 при ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» по адресу: 420015, Казань, ул. К. Маркса, 68 (корп. А, зал заседаний Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет».

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000687475

Автореферат разослан «2» октября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Е.Н. Черезова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы заключается в синтезе олигомерных систем на основе аминокислот и изотиоцианатов, которые позволяют решать проблему пролонгации действия практически важного химического объекта за счет усложнения его физико-химической организации. Именно такая ситуация наблюдается в случае использования азот- и серосодержащих соединений при решении задач, к которым относятся очистка сточных вод, рециклинг технической и питьевой воды, борьба с вредителями в сельском хозяйстве.

В качестве основных химических веществ в решении перечисленных задач в настоящее время используются низкомолекулярные органические соединения. Основным эксплуатационный недостаток таких соединений состоит в их низком коэффициенте полезного использования вследствие быстрого самопроизвольного разрушения и удаления из почвенных систем и сточных вод.

До настоящего времени работы по синтезу тиокарбамидов и тиогидантоинов, получаемых взаимодействием изотиоцианатов с аминокислотами, рассматривались лишь как возможность синтеза низкомолекулярных органических соединений. Основываясь на данных о способности тиомочевины находиться в двух таутомерных формах, на наш взгляд, реакции рассматриваемых систем при определенных условиях их осуществления могут приводить к олигомерным системам за счет межмолекулярных взаимодействий меркаптогруппы изотиокарбамида с карбоксильной группой второй молекулы.

Цель данной работы состоит в установлении условий проведения олигомеризации в реакциях аминокислот с изотиоцианатами и оценки влияния pH среды на характер данных превращений.

Научная новизна состоит в системном исследовании влияния pH среды на характер превращений в реакциях аминокислот с изотиоцианатами, которая позволила установить возможность протекания, во-первых, олигомеризации в реакциях аминокислот с изотиоцианатами, во-вторых, реакции гомополиконденсации глицина в водно-щелочной среде. Показана зависимость влияния pH среды на состав и структуру олигомерных соединений. Впервые исследованы процессы биотрансформации синтетических серосодержащих олигомерных соединений на основе глицина с изотиоцианатами накопительными культурами сереоокисляющих микроорганизмов.

Практическая значимость работы состоит в том, что найдены возможности синтеза новых олигомерных структур, полученных на основе аминокислот и изотиоцианатов в водно-щелочной среде. Показано эффективное применение продуктов олигомеризации глицина с изотиоцианатами в качестве стимуляторов роста и развития сероокисляющих микроорганизмов.

Апробация работы. Полученные в работе результаты докладывались на региональной научной студенческой конференции (Чебоксары, 2006), II и

III Санкт-Петербургских конференциях молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2006, 2007), IV Всероссийской Каргинской конференции «Наука о полимерах 21-му веку» (Москва, 2007), X Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2009), XIII Международной конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения» (Казань, 2009), Всероссийской конференции с элементами научной школы «Проведение научных исследований в области синтеза, свойств и переработки высокомолекулярных соединений, а также воздействия физических полей на протекание химических реакций» (Казань, 2010).

Публикации. По материалам работы опубликованы 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов диссертаций, 6 тезисов докладов на научных конференциях различного уровня, в том числе международных.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов и списка использованных источников.

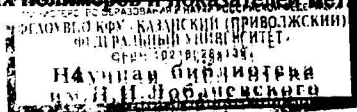
Первая глава «Реакции изотиоцианатов и продуктов их взаимодействия с аминокислотами» содержит пять основных разделов, которые описывают реакционную способность изотиоцианатов, характерные особенности строения и свойств аминокислот и взаимодействие аминокислот с изотиоцианатами в целом. Приведена зависимость влияния pH среды на реакционную способность тиольной формы тиокарбамидов.

Вторая глава содержит основные результаты по исследованию реакций аминокислот с изотиоцианатами в водно-щелочной среде при 100-110°C и их обсуждение. Показано влияние pH среды на направление реакций олигомеризации и структуру, полученных соединений.

Третья глава состоит из двух разделов. В первом разделе «(Co-) поликонденсация аминокислот» описываются наиболее известные методы получения полиаминокислот и их сополимеров, а также особенности структуры, свойства и области их применения. Второй раздел «Гомополиконденсация глицина» содержит результаты по исследованию влияния pH среды на поликонденсацию глицина, полученные автором работы.

Четвертая глава рассматривает возможность применения продуктов реакции изотиоцианатов с аминокислотами в качестве стимуляторов роста и развития сероокисляющих микроорганизмов, основываясь на данных литературных источников и результатах проведенных исследований.

В пятой главе «Экспериментальная часть» даны характеристики применявшихся в работе аминокислот и изотиоцианатов, методики проведения синтеза продуктов поликонденсации, культивирования культур и микропирование микробных образцов, а также методы исследования структуры и свойств полученных соединений.



Общий объем диссертации 145 страницы, включая 151 источник литературы, 17 таблиц и 34 рисунка.

Благодарности. Автор выражает глубокую и искреннюю признательность докторам химических наук: профессору Самуилову Я.Д., профессору Галибееву С.С., профессору Архирееву В.П.; доктору педагогических наук, кандидату технических наук, профессору Кочневу А.М. за помощь в постановке задач и обсуждении результатов исследований; доктору технических наук, профессору Сироткину А.С. за помощь в постановке эксперимента по пятой части работы и интерпретации полученных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования в работе служили реакции аминокислот с изотиоцианатами. В качестве аминокислот были использованы: глицин (ГЛ), β -аланин (β -АЛ) и 4-аминобутановая кислота (4-АБК); изотиоцианатов – метилизотиоцианат (МИТЦ), аллилизотиоцианат (АИТЦ), фенилизотиоцианат (ФИТЦ).

В работе были использованы современные методы исследования: ближняя и средняя ИК-спектроскопия, протонный ядерный магнитный резонанс, УФ-спектрофотометрия, элементный анализ, Малди масс-спектрометрия, гельпроникающая хроматография.

2. Реакции аминокислот с изотиоцианатами

Вследствие того, что вода является практически единственным растворителем, в котором растворяются аминокислоты, синтезы проводили в водной среде. Реакцию аминокислот с изотиоцианатами вели в щелочной среде, в интервале pH 8.0 – 11.0, для создания которой использовали NaOH. Взаимодействия проводили при постоянном механическом перемешивании.

Изучение влияния температуры на выход продуктов взаимодействия ГЛ с ФИТЦ в присутствии гидроксида натрия за 4 часа показало, что проведение реакции при температуре 100°C позволяет получать продукты с большими выходами по сравнению с реакциями, осуществляемыми при 50 и 80°C (табл.1). В реакции ГЛ с ФИТЦ и АИТЦ получалась вязкая масса от темно-оранжевого до темно-красного цвета, а в случае использования МИТЦ – порошкообразный продукт темно-коричневого цвета. Взаимодействие β -АЛ и 4-АБК с ФИТЦ приводило к получению карамелеобразного продукта светло-коричневого цвета. Из получаемых продуктов при температуре их размягчения можно было получить нити. Это указывало на то, что полученные соединения имеют достаточно высокую молекулярную массу.

Методом ГПХ было обнаружено, что среднечисленная молекулярная масса продукта взаимодействия ГЛ с ФИТЦ в зависимости от pH среды варьируется от 1340 D до 7240 D (табл.2), причем олигомерные продукты имели унимодальное ММР, что свидетельствует об их однородности по

Таблица 1. Влияние температуры синтеза на выход (мас.%) продуктов взаимодействия фенилизотиоцианата с глицином при различных рН среды

Температура синтеза, °С	рН среды		
	8	9	10
	Выход продуктов, масс.%		
50	0	7	10
80	0	13	21
100	12	16	30

составу. Значения среднечисленных и среднемассовых молекулярных масс для продуктов взаимодействия ГЛ с МИТЦ составили в пределах 1320 и 1870 D и ГЛ с АИТЦ – 5260 и

7840 D (рН 8-10). Выход продуктов олигомеризации ГЛ с изотиоцианатами растет с увеличением рН среды (табл. 3).

Таблица 2. Данные гель-проникающей хроматографии продуктов взаимодействия фенилизотиоцианата с различными аминокислотами, полученных при различных рН среды

Значение рН	\overline{M}_n	\overline{M}_w	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
	ФИТЦ + ГЛ		
8	1340	1690	1,26
9	5820	7630	1,31
10	7240	12100	1,67
11	3220	4970	1,54
	ФИТЦ + 4-АБК		
	\overline{M}_n	\overline{M}_w	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
9	830	950	1,14
10	890	1080	1,21
	ФИТЦ + β -АЛ		
	\overline{M}_n	\overline{M}_w	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$
9	730	820	1,12
10	990	1240	1,25

Таблица 3. Влияние рН среды на выход продуктов взаимодействия изотиоцианатов с аминокислотами при 100°С

Продукты поликонденсации	Выход продукта, %			
	рН среды			
	8	9	10	11
ГЛ + ФИТЦ	12	16	30	80
ГЛ + МИТЦ	2	42	80	85
ГЛ + АИТЦ	2	10	60	83
β -АЛ + ФИТЦ	3	40	50	8
4-АБК + ФИТЦ	2	40	45	4

Увеличение выхода продуктов взаимодействия в реакциях аминокислот с изотиоцианатами с возрастанием рН среды связано с тем, что при этом растет количество непротонированных аминогрупп (рис.1). В реакцию вступают свободные аминогруппы. Поэтому является естественным, что с увеличением рН среды возрастает выход продуктов в рассматриваемых превращениях. Ионизированная карбоксильная группа обладает слабым электронодонорным эффектом (индуктивная константа σ_I равна минус 0,05). Такой заместитель увеличивает нуклеофильные свойства аминогруппы, что облегчает протекание реакции с изотиоцианатами.

Однако существует еще один фактор, влияющий на выход образуемых продуктов взаимодействия – это устойчивость синтезированных соединений к щелочной среде. При высоких значениях рН (>11) снижается устойчивость образующихся продуктов, которая зависит от природы исходных аминокислот. Этот факт наблюдается в ряду β -АЛ и 4-АБК с ФИТЦ. Уже при рН 11 выход продуктов взаимодействия данных аминокислот с ФИТЦ резко уменьшается.

рН Среды может оказывать влияние не только на реакционную способность аминокислот, но и изотиоцианатов. Поскольку синтез проводили в водно-щелочной среде, то представляло интерес исследовать превращения изотиоцианатов в условиях проведения синтеза.

Известно, что изотиоцианаты очень медленно реагируют с водой. В ходе реакции образуются амин, сероводород и углекислый газ. Для выявления возможности протекания данного процесса в условиях проведения реакции изотиоцианатов с аминокислотами, изучен гидролиз ФИТЦ при 25 °С и 90 °С в течении 24 часов при рН среды, равной 7+8. В ходе реакции не было зафиксировано выделение сероводорода и не происходили какие-либо изменения с реакционной средой (выпадения осадка или изменение окраски). Это указывает на то, что используемые в работе

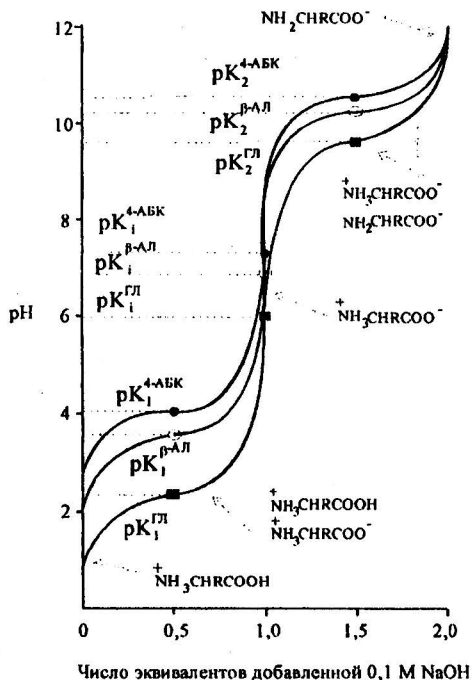


Рис.1. Кривые титрования аминокислот щелочью.
 pK_1 – изоэлектрическая точка,
 pK_1' , pK_2 – константы диссоциации карбоксильной группы и аминогрупп соответственно

изотиоцианаты в условиях проведения синтеза в указанном интервале pH не подвергаются сколь-нибудь существенному гидролизу.

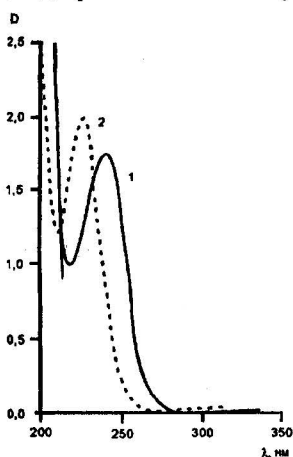


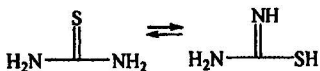
Рис. 2 УФ-спектры ФИТЦ в водно-щелочной среде: 1) при pH 8, 2) при pH 10

Данный вывод подтверждается исследованиями УФ спектров реакционных смесей. ФИТЦ в нейтральных средах имеет максимум поглощения при 236 нм. УФ спектры ФИТЦ при pH среды 8, остаются неизменными в течение продолжительного времени (рис. 2, кривая 1). Однако в щелочной среде при pH среды 10 происходит смещение поглощения волны до 220 нм (рис. 2, кривая 2), что свидетельствует об образовании в этом случае N,N' -дифенилтиокарбамида.

Учитывая то, что в щелочной среде изотиоцианаты способны подвергаться гидролизу и то, что аминокислоты в этих же условиях являются наиболее реакционно-способными, возникает вопрос: какая из этих двух реакций протекает быстрее в условиях проведения наших синтезов (100°C).

К. Сејрес с сотр. спектрофотометрически изучили реакции изотиоцианатов с аминокислотами. Отмечали, что в водно-щелочной среде протекают как реакции гидролиза изотиоцианатов, так и реакции с аминокислотами, причем с ростом pH среды взаимодействие с аминокислотами становятся более предпочтительными, по сравнению с процессами гидролиза.

Известно, что структура молекулы тиомочевин может быть представлена резонансными формами. Преобладание той или иной таутомерной формы зависит от многих факторов. Так, в работе проф. Струнина Б.П. по данным ^{13}C ЯМР отмечено, что при $\text{pH} > 10$ преимущественно преобладает изотиомочевинная форма.

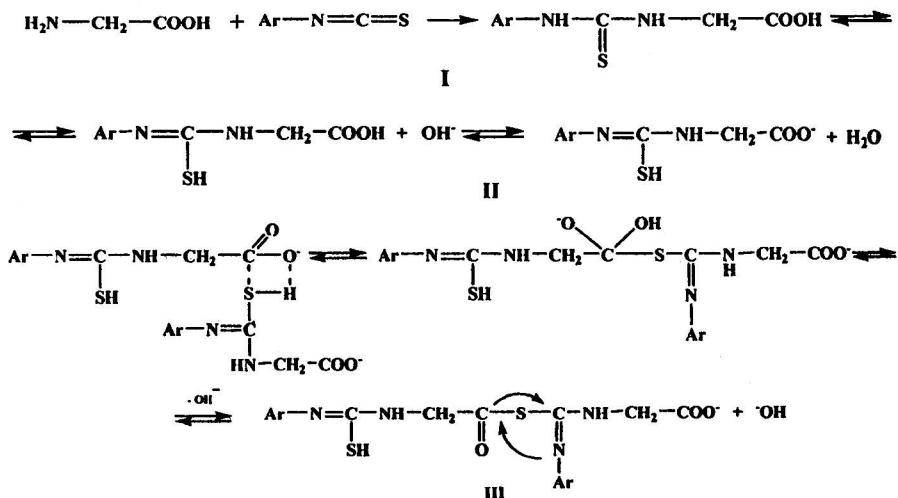


Реакционная способность SH-группы в тиомочевине обусловлена нуклеофильной активностью тиокарбонильного атома серы, а не атома азота. Активность меркаптогруппы по сравнению с аминогруппой подтверждается многими работами. Так, тиомочевины способны протонироваться, алкилироваться галогеналканами, спиртами в кислой среде, образуя продукты присоединения по кратным связям, взаимодействовать с лактонами, ангидридами, карбоновыми кислотами по тиокарбонильному атому серы.

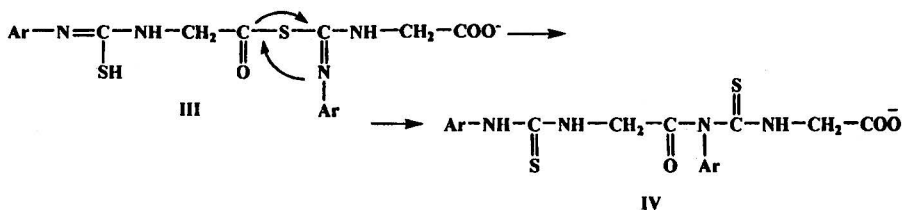
Основной причиной образования полимерных продуктов при 100°C, на наш взгляд, является катализируемая основаниями олигомеризация за счет межмолекулярного взаимодействия меркаптогруппы в карбоксиазо-

метинтиолах (II) одной молекулы с карбоксильной группой второй молекулы. В данном случае могут реализоваться несколько направлений:

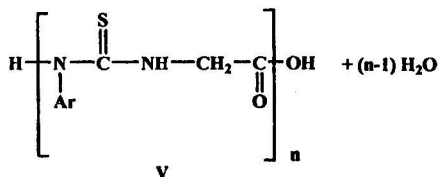
1 направление:



Этот процесс приводит к получению тиоэфиров карбоновых кислот (III). Далее интермедиат (III) стабилизируется путем S → N миграции ацильного фрагмента с образованием бис-тиомочевинной структуры (IV):



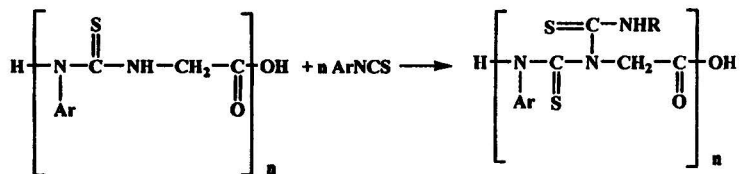
В результате последовательного повторения актов взаимодействия соответствующих групп данный тип превращения должен привести к формированию олигомера структуры (V):



В случае подобных превращений синтезированный олигомер на основе ФИТЦ с ГЛ должен содержать 16,7% серы.

2 направление:

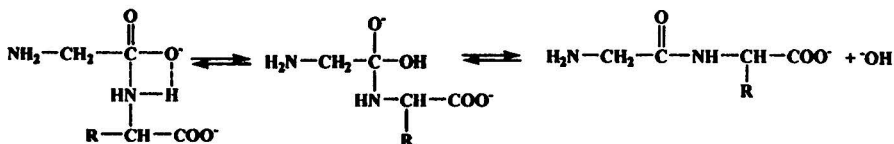
Образующийся первичный олигомер принципиально способен присоединять вторую молекулу изотиоцианата:



При протекании этого процесса содержание серы в полученном олигомере возрастает. Например, продукт взаимодействия ФИТЦ с ГЛ при реализации данного направления должен содержать 19,57% серы.

3 направление:

Другая возможность образования полимерных продуктов обусловлена гомополиконденсацией аминокислот с участием карбоксильных групп либо продуктов взаимодействия аминокислот с изотиоцианатами, либо самого ГЛ:



Последняя реакция должна приводить к формированию в структуре полимера блоков полиглицина и снижению в продуктах содержания серы.

Естественно, указанные выше реакции аминокислот с изотиоцианатами, могут протекать одновременно. Однако, опираясь на данные о содержании серы в получаемых продуктах, можно судить о преобладании того или иного направления превращений. В таблице 4 приведены сведения о содержании серы в олигомерах ФИТЦ с различными аминокислотами. Из которых следует, что в интервале pH 9–10 для взаимодействия ФИТЦ с ГЛ преобладает первое направление реакции, при pH 8 – второе, при pH 11 – третье.

Увеличение аминокислотных фрагментов в образующихся полимерах с возрастанием pH среды имеет место и в случае реакции АБК с ФИТЦ, однако для реакции β-АЛ проявляется обратная тенденция.

Переход от ароматического изотиоцианата к алифатическим приводит к тому, что получаемые олигомеры существенно обогащаются полиглициновыми блоками (табл.4). Причиной наблюдаемого явления, видимо, является то, что в присутствии алифатического заместителя тиолазметинового таутомер становится менее устойчивым по сравнению с тиомочевинным.

Изучение кинетических кривых по выходу продукта взаимодействия ГЛ с ФИТЦ показало, что увеличение pH среды приводит к возрастанию скорости его образования (рис.3).

Таблица 4. Содержание серы в продуктах взаимодействия аминокислот с изотиоцианатами при различных рН среды

Соединение	Содержание серы, %				
	Рассчитано*	найдено			
		рН 8	рН 9	рН 10	рН 11
ГЛ + ФИТЦ	16,70	18,17	16,71	16,98	7,72
β -АЛ + ФИТЦ	15,53	—	11,94	14,30	14,12
АБК + ФИТЦ	12,60	—	12,02	11,01	—
ГЛ + АИТЦ	20,51	—	—	13,92	8,04
ГЛ + МИТЦ	24,62	—	2,77	9,06	—

* расчет производился из условия вступления в реакцию одной молекулы аминокислоты с одной молекулой изотиоцианата

Скорость расходования ГЛ также показывает зависимость влияния основности среды на процесс олигомеризации в данных реакциях (рис.4). Более детальный анализ данных кривых позволяет выделить три временных участка, отличающихся по скорости образования продукта и вступления в реакцию аминокислоты: 0-30 мин, 30-60 мин, 60-250 мин.

Первый временной участок, существенно не зависящий от рН среды, связан с образованием тиомочевины. Об этом свидетельствует спектр ЯМР ^1H продукта взаимодействия ГЛ с ФИТЦ, выделенного через 25 минут

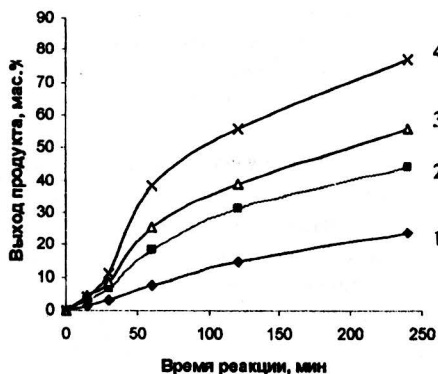


Рис. 3. Зависимость выхода продуктов взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом, полученных при рН среды:
1 – 8; 2 – 9; 3 – 10; 4 – 11

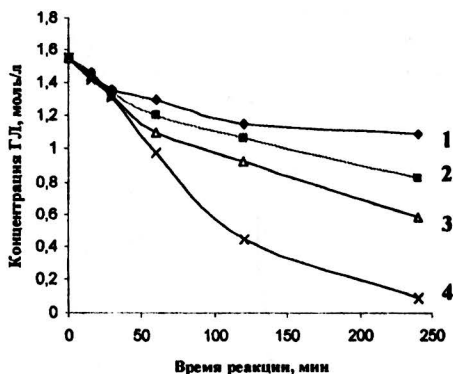


Рис. 4. Кинетические кривые реакций взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом при 100°C и рН среды:
1 – 8; 2 – 9; 3 – 10; 4 – 11

после начала реакции. Как видно из рисунка 5 в области 4,1-4,3 м.д. наблюдаются химические сдвиги протонов CH_2 -группы аминокислотной составляющей. Сигналы в области 7,2-7,7 м.д. характерны протонам ароматического кольца изотиоцианатного фрагмента. Наличие хим.сдвигов в

областях 10,1-10,4 м.д. (протоны COOH -группы) и 7,8-7,9 м.д. (протоны NH -групп) подтверждают образование тиомочевины.

Увеличение pH среды приводит к образованию большого количества изотиомочевинных форм, являющихся более реакционноспособными по сравнению с тиомочевинными, которое влияет на рост скорости образования продуктов на втором временном участке (рис.3), который связан со взаимодействием тиомочевин друг с другом. Сравнение спектра ЯМР ^1H продукта взаимодействия ГЛ с ФИТЦ, выделенного через 60 минут после начала реакции со спектром ЯМР ^1H продукта, выделенного через 30 минут, показывает, что происходит уширение области, характерной протонам CH_2 -группы (4,0-4,6 м.д., рис.6).

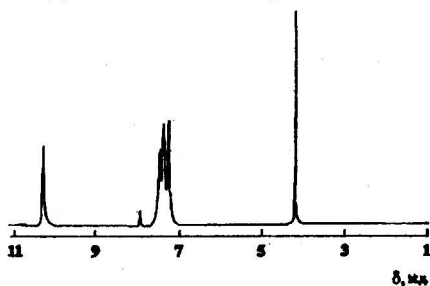


Рис.5 Спектр ЯМР ^1H продукта взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом при pH 10, выделенного через 25 мин после начала реакции

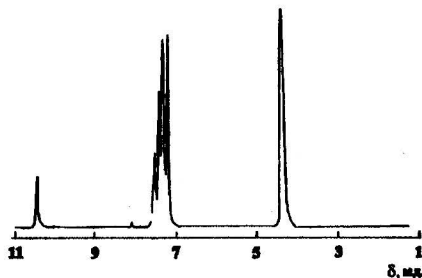


Рис.6 Спектр ЯМР ^1H продукта взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом при pH 10, выделенного через 60 мин после начала реакции

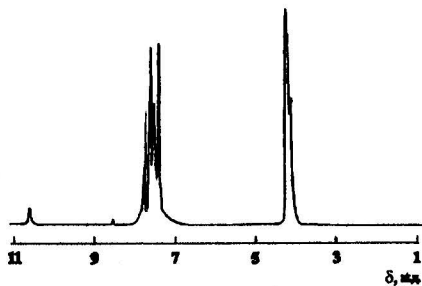


Рис.7 Спектр ЯМР ^1H продукта взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом при pH 10, выделенного через 240 мин после начала реакции

Это связано с изменением химической структуры продуктов взаимодействия и косвенно свидетельствует об увеличении ММ изучаемого образца. Изучение химической структуры продукта, выделенного через 240 минут после начала реакции показывает уменьшение интенсивности сигнала, характерного протонам COOH -группы (10,1-10,4 м.д., рис.7).

Сопоставление интегральных интенсивностей протонов COOH -группы к протонам CH_2 -

групп для всех значений pH среды говорит об уменьшении количества COOH -групп в структуре продуктов взаимодействия ГЛ с ФИТЦ в ходе

реакции (табл.5). Сопоставление интегральных интенсивностей протонов ароматического кольца (от изотиоцианата) к протонам CH_2 -групп (от аминокислоты) подтверждает сделанное ранее предположение о влиянии pH среды на структуру конечного продукта: 1) при pH 9-10 структура продуктов состоит из одинакового количества глициновой составляющей и изотиоцианатной; 2) при pH 8 в структуре преобладают ароматические фрагменты; 3) при pH 11 наоборот наблюдается избыток CH_2 -групп (табл. 5).

Таблица 5. Отношение интегральных интенсивностей сигналов протонов COOH -группы к протонам CH_2 -группы $\int_{(10,1-10,4)} / \int_{(4,0-4,6)}$ и протонов ароматического кольца к протонам CH_2 -группы $\int_{(6,9-7,6)} / \int_{(4,0-4,6)}$, полученных ЯМР ^1H спектроскопией, в зависимости от pH среды и времени реакции

pH	Время реакции, мин	$\int_{(10,1-10,4)} / \int_{(4,0-4,6)}$	$\int_{(6,9-7,6)} / \int_{(4,0-4,6)}$
8	30	0,553	2,532
	60	0,385	2,814
	240	0,153	2,965
9	30	0,486	2,578
	60	0,193	2,625
	240	0,045	2,593
10	30	0,463	2,563
	60	0,178	2,594
	240	0,032	2,625
11	30	0,519	2,469
	60	0,095	2,086
	240	0,015	1,132

Кроме того, образование в структуре полимера блоков полиглицина подтверждается характером кривой расходования ГЛ при pH 11 (рис.4, кривая 4). Данная кривая имеет более продолжительный второй временной участок, обусловленный как взаимодействием тиомочевин друг с другом, так и расходованием ГЛ на образование блоков.

Обобщая данные рисунков 3, 4 можно сделать вывод, что при pH 11 в реакционной среде остается большое количество невступившего в реакцию ФИТЦ (порядка 30 мол.%), в то время как только 6 мол.% ГЛ не вступает в реакцию.

Переход от эквимольного соотношения реагентов реакционной среды к двукратному избытку ГЛ позволил повысить выход конечного продукта до 99 мас.% (рис.8), что в свою очередь привело к снижению непрореагировавшего изотиоцианата.

На ИК-спектре продукта взаимодействия ГЛ с ФИТЦ обнаруживаются полосы при 1755 см^{-1} (валентные колебания групп $\text{C}=\text{O}$), $1625-1575 \text{ см}^{-1}$ (ароматическое кольцо), 1280 см^{-1} (валентные колебания группы $\text{C}=\text{S}$ в соединениях с открытой цепью), $1416-1400 \text{ см}^{-1}$ (деформационные

колебания группы CH_2), что подтверждает образование предполагаемой выше структуры полимеров.

3. Гомополиконденсация глицина

Предпосылкой изучения реакции гомополиконденсации ГЛ в водно-щелочной среде явилось предположение об образовании при pH 11 в структуре полимера блока полиглицина.

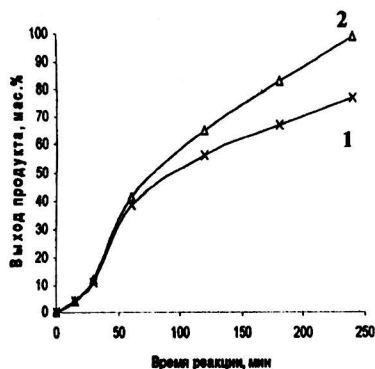


Рис. 8. Зависимость выхода продуктов взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом при температуре 100°C , полученных при pH среды 11 и молярном соотношении реагентов: 1 – 1:1; 2 – 2:1

Изучение реакции проводили в водно-щелочной среде при pH 8–11. В качестве оснований использовали LiOH, NaOH, KOH. Температура реакционной среды поддерживалась в пределах $100 \pm 10^\circ\text{C}$. По окончании процесса получили вязкую массу белого цвета. Синтезируемые соединения очищали переосаждением в системе: «вода – ацетонитрил» и сушили на воздухе до постоянного веса. Нейтрализация щелочи в продуктах гомополиконденсации проводилась 1н. раствором соляной кислоты. Выход продуктов после экстракции представлен в таблице 6.

Таблица 6. Внешний вид и выход продуктов гомополиконденсации глицина

pH	Внешний вид после очистки	Выход, %		
		LiOH	NaOH	KOH
8	Белые кристаллы	91	89	95
9	Белые кристаллы	90	92	97
10	Вязкая масса белого цвета	97	95	95
11	Вязкая масса белого цвета	96	96	97

Полученные соединения хорошо растворяются в воде, разбавленных кислотах и щелочах, уксусной кислоте и не растворимы в органических растворителях.

Для идентификации структуры синтезированных соединений использовали ЯМР ^1H и ИК-спектроскопию. На спектрах ЯМР ^1H соединений, полученных при pH 8–11, имеются явные различия. Видно, что ЯМР ^1H спектры соединений, синтезированных при pH 8–9, полностью совпадают со спектром ГЛ. Это позволяет сделать вывод о том, что при таких

значениях pH среды реакция образование олигомеров не происходит (рис.9, кривая а,б).

На ЯМР H^1 спектре продукта, полученного при pH 11 наблюдается совершенно другая картина (рис. 9, кривая с). Так, появляются новые сигналы при 3.20-3.30 м.д. и 3.30-3.37 м.д., которые свидетельствуют о получении нового продукта реакции. Происходит смещение сигнала в область сильных полей, которое связано с изменением окружения группы CH_2 . Кроме того, наблюдается отсутствие химического сдвига в области 4.80-4.60 м.д., который характеризует протон NH -группы ГЛ.

На ЯМР H^1 спектре продуктов, полученных с LiOH (рис. 10), наряду с сигналами продукта содержится сигнал протонов NH_2 -группы, соответствующей глицину. Наблюдается зависимость характера получаемых продуктов от ионного радиуса щелочного металла. Известно, что в зависимости от размера ионного радиуса щелочные металлы обладают способностью образовывать ионные пары, которые сильно влияют на их активность. В случае LiOH образуются наиболее тесные ионные пары. Такие ионные пары малоактивны в катализе процесса поликонденсации. Катион калия, имеющий наибольший ионный радиус среди рассматриваемых ионов металлов, приводит к образованию «рыхлой» ионной пары. Такие ионные пары проявляют большую активность. При катализе КОН образуется полимер с более высокой молекулярной массой. Это следует из полученных нами данных по исследованию синтезированных

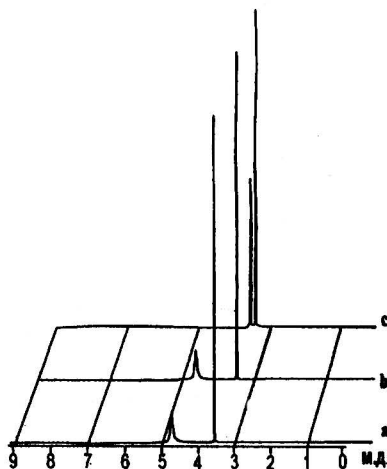


Рис. 9. Спектры ЯМР H^1 : глицина (а), продуктов гомополиконденсации глицина, полученных при pH 9 (б) и pH 11 (с) с использованием NaOH

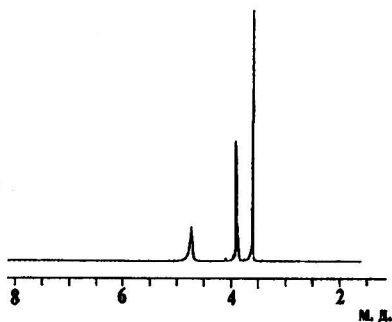


Рис.10. ЯМР H^1 продукта гомополиконденсации глицина при pH 11 с использованием LiOH

продуктов методом Малди масс-спектрологии.

Наибольшей молекулярной массой обладает продукт, полученный при использовании в качестве щелочи КОН ~831 D (рис.11), меньше у продукта, полученного с NaOH ~ 810 D, и еще меньше у продукта, полученного с LiOH ~ 521 D. Значения молекулярных масс сопоставимы с литературными

данными, из которых полиглицин имеет молекулярную массу в пределах 500-5000 D.

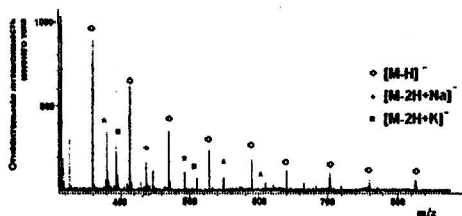


Рис.11 Малди масс спектр полиглицина, полученного при использовании KOH при pH 10

На ИК-спектре синтезированного при pH 10-11 продукта имеется полоса поглощения при 3380 см⁻¹, обусловленная наличием группы NH, участвующей в образовании водородной связи. Также у всех пептидов

(полиаминокислот) имеются полосы амид-I и амид-II в областях 1600-

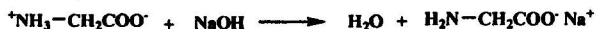
1500 см⁻¹. При 1600 см⁻¹ происходит наложение полос поглощения C(O)O⁻ и амида-II. Полоса в области 1400 см⁻¹ соответствует поглощению группы C(O)O⁻. Кроме того, замечена слабая полоса вблизи 3080 см⁻¹, интерпретированная как дополнительное поглощение группы NH. Все полиглицины поглощают вблизи 1015±5 см⁻¹, и это поглощение можно считать характеристическим для диглициновой структуры. Подобные поглощения отсутствуют у образцов, полученных при pH 8-9, что говорит о возможном образовании полиглицина при pH 10-11.

На УФ-спектре полоса поглощения пептидной группы находится в области 180-230 нм. Синтезированное соединение при pH 10 имеет поглощение при 220 нм, которое свидетельствует об образовании пептидной группы. Данная полоса поглощения наблюдается у всех полученных продуктов при pH 10 и 11.

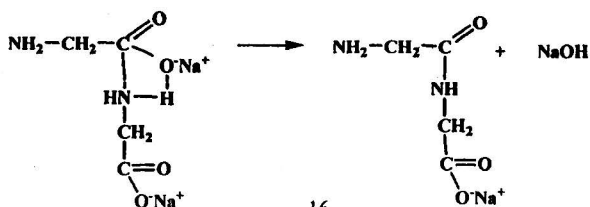
ДСК кривая продукта поликонденсации ГЛ при pH 11 содержит один широкий эндотермический пик с диффузностью в 50°C. Сравнение с ДСК кривой ГЛ показало, что этот эффект наблюдается ниже температуры плавления ГЛ (262°C). Это также подтверждает образование нового полимерного продукта.

Протекание поликонденсации можно представить следующим комплексом превращений:

1. Стадия иницирования аминокислоты:



2. Стадия роста цепи:



Далее процесс взаимодействия повторяется в соответствии с уравнением второй стадии.

Данный механизм реакции реализуется лишь при pH среды равным 10-11. При pH 8-9 реакция не протекает. Это видимо, связано с тем, что при таком значении pH аминокислота существует в основном в виде нейтрального биполярного иона.

4. Эффективность стимулирования сероокисляющих микроорганизмов продуктами поликонденсации глицина с изотиоцианатами

Одной из серьезных экологических проблем является накопление сульфидов как чрезвычайно токсичных соединений в сточных водах ряда химических предприятий. Особенность поведения сульфидов в водной среде обуславливает выраженное вредное влияние их на санитарный режим водоёма – быстрое связывание кислорода, растворённого в воде. Они так же вредно влияют и на органолептические свойства воды.

Благоприятное воздействие на рост и развитие микроорганизмов оказывает внесение в среду сбалансированного комплекса биогенных добавок и микроэлементов. Поэтому предметом нашего дальнейшего рассмотрения является возможность использования продуктов поликонденсации аминокислот с изотиоцианатами в качестве стимуляторов сероокисляющих микроорганизмов.

Так, исследованию подвергались накопительная культура активного ила (СОМ АИ) биологических очистных сооружений тиокольной очереди ОАО «Казанский завод синтетического каучука» и накопительная культура, выделенная из почв Башкортостана. В качестве стимулирующих соединений были отобраны продукты олигомеризации ГЛ с МИТЦ (I) и ГЛ с ФИТЦ (II), полученных при pH 11. Использование данных продуктов поликонденсации обусловлено их хорошей растворимостью в воде.

Для культивирования почвенных сероокисляющих микроорганизмов были приготовлены питательные среды, главное отличие которых заключалось в наличии или отсутствии в них продуктов поликонденсации аминокислоты с изотиоцианатами.

Анализ данных по приросту живых клеток показал, что развитие биомассы по числу КОЕ почвенной культуры, в присутствии продукта I, характеризуется большим приростом – на 11,8%, чем для культуры с тиосульфатом натрия.

В соответствие с полученными данными (изменение числа КОЕ), можно говорить, что вещество I простимулировало развитие сероокисляющих микроорганизмов накопительной культуры СОМ. В то время почвенная культура, культивируемая продуктом II, к 15 суткам увеличила свою биомассу в 2,5 раза, при этом биомасса в системе без продукта поликонденсации ГЛ с ФИТЦ выросла в 4 раза.

Уменьшение к 4 суткам культивирования пика на УФ-спектре, соответствующего продукту I, свидетельствует о полном ее потреблении микроорганизмами.

В процессе роста культуры наблюдалось биоокисление тиосульфата натрия. Активизация данного процесса произошла на 4 сутки культивирования. К 15 суткам в питательной среде культуры COM, культивируемой без продукта I, оставалось 88 % субстрата. Остаточное содержание субстрата для почвенной культуры с продуктом I составило 20 %. Обобщая данные о биотрансформации продукта I и биоокислении субстрата, можно сделать вывод о том, что активное потребление тиосульфата началось только после того, как в среде был исчерпан продукт I. Можно также предположить, что данное вещество является более легко усвояемым субстратом для сероокисляющих микроорганизмов, благодаря его химической природе.

Использование же олигомерного продукта II, не оказывает стимулирующее воздействия на развитие сероокисляющих микроорганизмов накопительной культуры COM, а наоборот замедляет прирост биомассы. В то же время, данное вещество, как и в первом случае, потребляется микроорганизмами полностью. Так, в начале эксперимента высота плеча связи C-S составила 0,92 опт.ед., ко 2 суткам значение снизилось до 0,87 опт.ед. После 5-х суток плечо не наблюдалось.

Сопоставляя данные по биодegradации и приросту бактериальной массы, можно сделать вывод, что в процессе окисления, в культуральную жидкость может выделяться фенильный радикал, который ингибирует процессы в клетках, то есть является токсикантом. Таким образом, II не оказывает стимулирующее воздействие на рост почвенных сероокисляющих микроорганизмов. Однако следует отметить, что субстрат в системе с продуктом поликонденсации ГЛ с ФИТЦ утилизируется практически на 50 % быстрее, чем в системе без него при этом наблюдалось более сильное защелачивание среды. Так, в исследуемой системе происходит процесс не полного биоокисления соединений серы, что может быть связано с преимущественным развитием микроорганизмов в составе накопительной культуры, неспособных вести процесс окисления до сульфатов.

Итак, исследование процессов биотрансформации синтетических серосодержащих олигомерных соединений – как единственных источников серы, накопительной культурой сероокисляющих микроорганизмов активного ила показало, что продукт поликонденсации ГЛ с МИТЦ подвергается эффективному биоокислению, в результате которого в среде накапливается значительное количество сульфатов. В то время как, продукт поликонденсации ГЛ с ФИТЦ плохо подвергается биотрансформации и не может быть рассмотрена как стимулятор микробной активности.

Выводы

1. Исследование влияния pH среды на характер превращений в реакциях аминокислот с изотиоцианатами позволило установить протекание

олигомеризации в реакциях аминокислот с изотиоцианатами за счет межмолекулярного взаимодействия меркаптогруппы в карбоксиазометинтиолах одной молекулы с карбоксильной группой второй. Среднечисленная молекулярная масса олигомеров по данным гелепроникающей хроматографии составляет от 730 до 7 240 D.

2. Методами элементного анализа и ЯМР H^1 показана зависимость влияния pH среды на химическую структуру олигомерных соединений. При pH 9-10 образуется олигомер в результате последовательного повторения актов взаимодействия соответствующих групп тиоэфиров карбоновых кислот, которые образуются в результате взаимодействия изотиоцианатов с аминокислотами на первой стадии. При pH 8 к вышеназванной структуре присоединяется вторая молекула изотиоцианата. При pH 11 структура олигомеров обогащена фрагментами полиаминокислот.

3. Структура образующихся олигомеров зависит от природы исходных реагентов. Продукты на основе глицина и 4-аминобутановой кислоты с фенилизотиоцианатом с ростом pH среды обогащаются аминокислотными фрагментами. Продукт на основе β -аланина с фенилизотиоцианатом наоборот обогащен фрагментами изотиоцианата. Олигомеры, полученные на основе алифатических изотиоцианатов, содержат в своей структуре блоки полиглицина.

4. Глицин в водно-щелочной среде при pH 10-11 и температуре реакции 100-110°C способен олигомеризоваться. В зависимости от ионного радиуса щелочного металла молекулярная масса полиаминокислоты изменяется от 521 до 831 D.

5. Процессы биотрансформации синтетических серосодержащих олигомерных соединений показали, что продукт на основе глицина с метилизотиоцианатом подвергается биоокислению и может быть предложен в качестве стимуляторов микробной активности. В то время как продукт на основе глицина с фенилизотиоцианатом не оказывает стимулирующего воздействия на рост сероокисляющих микроорганизмов.

Публикации в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертаций:

1. Yakusheva, A. V. Effect of pH of a Medium on the Direction of Reactions of sothiocyanates with Amino / A. V. Yakusheva, S. S. Galibeev, R. R. Spiridonova, Ya. D. Samuilov, and A. M. Kochnev // Polymer Science, Ser. B – 2008. - V.50, №11–12. – P.321-325.
2. Якушева, А.В. Влияние pH среды на получение полиаминокислот / А.В. Якушева, Л.Р. Зарипова, Р.Р.Спиридонова, Я.Д.Самуилов, А.М.Кочнев // Вестник Казанского технологического университета. – 2009. – №3. – С.65–71.
3. Якушева, А.В. Стимулирование сероокисляющих микроорганизмов в процессах биологической очистки сточных вод химических производств / А.В. Якушева, Е.В. Перушкина, А.В. Львова, Р.Р. Спиридонова,

102
А.С.Сироткин, С.С. Галибеев, А.М. Кочнев // Химическая промышленность сегодня. – 2009. – №10. – С.39–49.

4. Якушева, А.В. Влияние pH среды на выход продуктов поликонденсации аминокислот с фенилизотиоцианатом / А.В. Якушева, Р.Р. Спиридонова, А.М. Кочнев, Я.Д. Самуилов // Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – №5. – С.62-66.

Научные статьи в сборниках и материалах конференций:

1. Якушева, А.В. Кинетика реакций взаимодействия глицина с фенилизотиоцианатом в щелочной среде / А.В. Якушева, Р.Р. Спиридонова, Я.Д. Самуилов, А.М. Кочнев // Тез. Докл. Всероссийской конф. с элементами научной школы для молодежи «Проведение научных исследований в области синтеза, свойств и переработки высокомолекулярных соединений, а также воздействия физических полей на протекание химических реакций». – Казань, 2010. – С.91.

2. Якушева, А.В. Катализируемая основаниями (со-)поликонденсация аминокислот с изотиоцианатом / А.В. Якушева, Р.Р. Спиридонова, С.С.Галибеев, А.М. Кочнев // Тез. Докл. XIII Международной конференция молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения». – Казань, 2009. – С.357.

3. Якушева, А.В. Некоторые полимерные стимуляторы сероокисляющих микроорганизмов / А.В. Якушева, Е.В. Перушкина, Р.Р. Спиридонова, А.С.Сироткин, А.М. Кочнев // Тез. докл. X Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии». – Казань, 2009. – С. 354.

4. Якушева, А.В. Влияние pH среды на свойства полииокарбамидов на основе глицина с фенилизотиоцианатами / А.В. Якушева, Л.Р. Зарипова, Р.Р.Спиридонова, С.С. Галибеев // Тез. Докл. 4 Всероссийская Каргинская конф. «Наука о полимерах 21-му веку». – М, 2007. – С. 273.

5. Зарипова, Л.Р. Влияние pH среды на получение полиглицина / Л.Р.Зарипова, А.В. Якушева, Р.Р. Спиридонова, С.С. Галибеев // Тез. докл. 3 Санкт-Петербургская конференция молодых ученых. Современные проблемы науки о полимерах. – СПб, 2007. – С. 39.

6. Якушева, А.В. Взаимодействие аминокислот с фенилизотиоцианатом / А.В. Якушева, С.А. Ирдинкин, Л.Р. Зарипова, Р.Р. Спиридонова // Тез. докл. II Санкт-Петербургская конференция молодых ученых. Современные проблемы науки о полимерах. – СПб, 2006. – С. 35.

Соискатель



А.В. Якушева

Заказ № 238

Тираж 100 экз.

Офсетная лаборатория КГТУ 420015, г. Казань, ул. К.Маркса, д.68